

# 第1回細管式等速電気泳動分析シンポジウム

## 講演要旨集

主 催	イソタコ研究会
共 催	日本化学会, 日本分析化学会
日 時	昭和56年11月27日(金)
会 場	新宿三井ビル40階 東京都新宿区西新宿2丁目1-1



# 第1回細管式等速電気泳動分析シンポジウム

プログラム

昭和56年11月27日(金) 9:30~16:30

## 午前の部

9:30 開会の辞

都立大・理 奥山典生

演題番号

9:35

1. 各種パン生地の有機酸分析

オリエンタル酵母工業研究所 ○嶋田 昇二・津久井弥生  
内田 浩二

9:50

2. 細管式等速電気泳動装置を用いた有機酸発酵の診断

岐阜大・農・農芸化学 ○堀津 浩章

10:05

3. 血清タンパク質の細管電気泳動

都立大・理・化学 ○小島 清嗣・真鍋 敬  
奥山 典生

10:20

4. 細管式等速電気泳動による含硫アミノ酸及びラクト組織のグルタチオンの定量

高知医大・化学 ○児玉 裕敬

10:35 休憩(25分)

11:00

5. 保存腎臓灌流血液及び尿中成分の量的変動

東京電機大・理工 ○村勢 則郎・権田 金治  
福井 康裕  
東大・医科 研 杉本 久之  
東大・工 土肥 健純

11:15

6. 臨床応用—特に血中有機酸、有機リン酸の測定について—

阪大・医・泌尿器科 ○山本 忠司  
仁真会 白鷺病院 山川 真

11:30

7. 等速電気泳動による食品中のEDTAの検出定量について

国立衛生試験所大阪支所 ○伊藤誉志男・鈴木 英世  
豊田 正武・慶田 雅洋

11:45

8. 文化財の保存とイソタコフオレシス

東京国立文化財研究所 ○新井 英夫・北村 満  
阿辺 明由

12:00~12:30 特別講演

欧州における等速電気泳動分析の最近の動向

広島大・工・応用理化学 木曾 義之

12:30~13:30 休憩

## 午 後 の 部

13:30~14:00 特別講演

赤血球の形態分析とヌクレオチド

埼玉医大・生化学 坂 岸 良 克

### 演題番号

14:00

9. 等速電気泳動分析におけるマイコンの利用 広島大・工・応用理化学 ○広川 健・木曾 義之

14:15

10. 細管式等速電気泳動分析における中性配位子の利用 九大・工・合成化学 ○田崎 正人・高木 誠  
上野 景平

14:30

11. イソタコによる糖の分析 近 畿 大 ・ 薬 ○本田 進・若狭 寿子  
千葉 裕一・掛樋 一晃

14:45

12. イソタコによるパーマネント・ウェーブ用剤の分析 中 野 製 薬 ○水口 浩之・萩 光義  
大原 国男

15:00 休憩(25分)

15:25

13. 高分子電解質の細管式等速電気泳動 資 生 堂 研 究 所 ○山本 信也

15:40

14. Isotachopheresisによる医薬品分析第一報コンドロイチン硫酸ナトリウム注射液の定量 大洋薬品工業・品質管理部 大平 一夫・酒井 淑行  
○近藤 紀己

15:55

15. Capillary Isotachopheresis の生薬分析への応用 鐘 紡 ・ 基 礎 研 , 漢 方 研 ○松居 宏典・木下 昌彦

16:10 総会討論(25分)

16:35 閉会の辞

奥 山 典 生

# 1 各種パン生地の有機酸分析

(オリエンタル酵母工業 研究所) ○嶋田昇二, 津久井弥生, 内田浩二

1) 目的. パン生地中の有機酸は高級アルコールとともにフレーバ物質として主要な成分の一つであり, パンの品質にも重要な役割をになっている. 我われはパンフレーバー (パンの香り) と有機酸との相関性を明らかにする目的で *Isotachopheresis* (= *Isotacho*) による有機酸分析を試み, 効率よく測定できることからパン生地中の有機酸による品質管理 (主としてパンの香りから) に適用し, とくにサワー種 (食パン, ライ麦パン用), 酒種 (菓子パン用) を含むパン生地の品質管理には効果的であるという結果を得たので報告する.

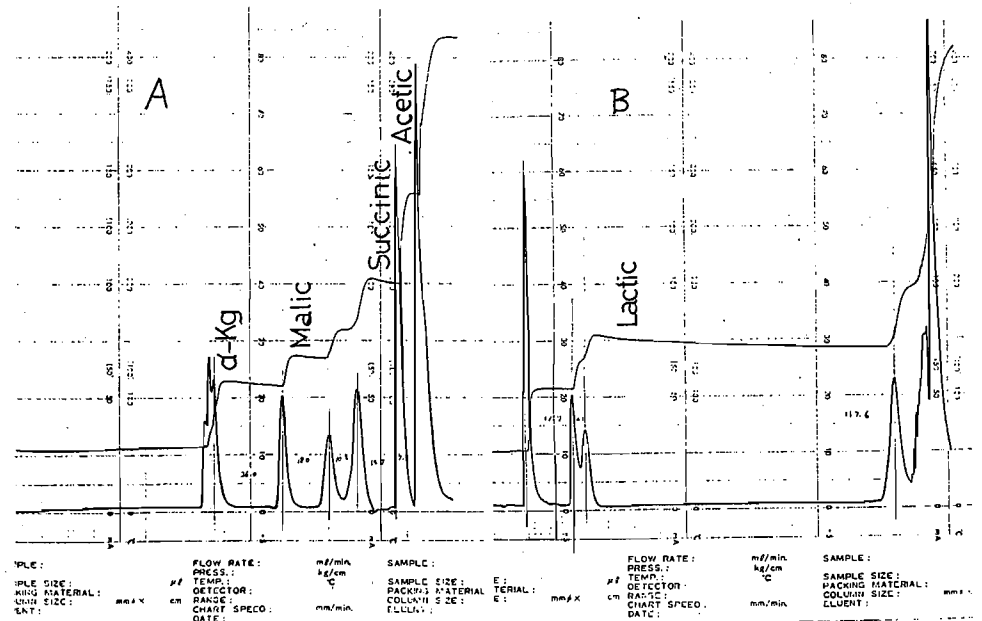
2) 実験方法. (1) 有機酸の抽出: パン生地 (crumb) 10g に脱イオン水 20 ml を加えて混合し, 室温に 30 分放置してから遠心分離 (12000 rpm, 10 min) する. 分離後上清液を 1 回濾過し, ろ液を試料として *Isotacho* に導入する. (2) 分析条件: 先行液は 10 mM HCl +  $\beta$ -ala, 0.2 % Triton X-100, pH 3.6. 後続液として 10 mM n-Caproic acid を使用した. キャピラリーチューブ, 20 cm, 泳動電流 100  $\mu$ A (or 50  $\mu$ A) であった. (3) 有機酸の定量: あらかじめ同一試料を用い, *Isotacho* およびカルボン酸計にて成分を同定し, *Isotacho* の Peak 間距離で定量した.

3) 結果. (1) 通常のパン生地中の有機酸は生地 1 に対して脱イオン水 2 の割合で混合したあと, 30 分程度で抽出される. 試料の導入量は 4~10  $\mu$ l が適量であった. (2) 生地中の有機酸成分の同定は *Isotacho* による R<sub>V</sub> 値およびカルボン酸計にて行い,  $\alpha$ -Ketoglutaric acid, Malic acid, Lactic acid, Succinic acid, Acetic acid の 5 つの酸を主成分として同定した. (3) パン生地中の有機酸は貯蔵中 (5 日間) はほとんど変化せず生地中にとどまっていた. パンの香りを問題にする場合, 初期の生地中の有機酸成分を調べることで十分である. (4) パン生地中に含まれる有機酸成分を測定することより, サワー種あるいは酒種の特徴を明らかにすることができた. 特にサワー種の場合, 乳酸菌であることより乳酸菌の種類と組み合わせ (混合比) でできたパン生地中の有機酸成分の分析とパンの香り (官能検査) から乳酸菌の特徴を容易に調べることができる.

食パン

A: コントロール

B: サワー種添加



## 2 細管式等速電気泳動分析を利用した有機酸発酵の診断

岐阜大学農学部農芸化学科, 嶋津若章, 足立重仁

近年、細管式等速電気泳動法の利用が多方面の研究分野へと拡大されている。この細管式等速電気泳動法には、試料の必要量が $\mu\text{g}$ あるいは $\mu\text{mole}$ 程度の少量である事、分析所要時間が30分程度と短時間である事、又試料イオン種濃度がゾーン内のどの部分においても一定であるため、その定量がゾーン幅を測定する事によって行えると言う定量の容易性さらにGCのように試料を気化誘導体にする必要のない事、液体クロマトグラフィーに見られる吸収妨害物質除去の不要な事などの特徴がある。一方、その分析試料により先行及び後続電解液の選択が必ずしも容易ではない事、分析対象物が電荷を持たねばならず、試料がある程度限定される事、GCに比較し、分析装置が多少高価である事などの難点もあるが、今後の発展により解決されて行くと思われる。そこで著者らは、微生物による有機酸発酵の一つである、クエン酸発酵において、その主たる生産物であるクエン酸、及び副産物であるグルコン酸やシュウ酸などの同時分析に細管式等速電気泳動法を利用したのでその実験例を紹介する。

分析には島津製作所のIP-1Bを使用した。分析条件は、電解液として先行電解液=0.01 M HCl,  $\beta$ -alanine, 0.2% Triton X-100, pH3.1, 後続電解液: 0.01 M n-caproic acid の組成の溶液を用い、キャピラリーチューブ=20cm, 泳動電流: 100 $\mu\text{A}$ , 恒温槽温度: 20 $^{\circ}\text{C}$ とした。定性分析の指標として、Potential Unit Value (PU値)を上記条件下で、種々の有機酸標準物質を用いて求めた。その結果をTable.1に示した。次に、クエン酸発酵液に主に存在するクエン酸、グルコン酸、シュウ酸の同時定量のための検量線をFig.1に示した。移動度の大きい順(シュウ酸 $\rightarrow$ クエン酸 $\rightarrow$ グルコン酸)に検量線の勾配も大きくなる事を示している。次に試料として、*Aspergillus niger* G-011株をmolasses (sucroseとして)10%, pH5.8の培地で96時間培養した後の培地上清、及び本菌より固定化菌体を調製し、10% sucroseを含む反応液(pH3.0)中で反応を行、た後の上清の原液又は倍数希釈液を用い泳動を行った。泳動図をFig.2に示した。このように良好な分離が得られた。これより有機酸同時分析が行える事によって、クエン酸発酵のみならず、他の有機酸発酵においても、各々の有機酸に対する定量操作が省かれ、簡便にその定量が行える事が期待出来る。しかし、発酵液中には各種の糖の存在が予想され、そのためにサンプリングバルブの流路内にならずかではあるが糸状菌が生育し、流路を詰まらせ、キャピラリーチューブ内の十分な洗浄を妨げたり、又バルブの構造上、使用頻度が高くなると、流路の切り換え部分にズレを生じたりする事を経験しており、細めなメンテナンスが必要と思われる。

Table.1. 有機酸のPU値

有機酸	PU値
citric acid	0.23
oxalic acid	0.08
gluconic acid	0.40
isocitric acid	0.29
itaconic acid	0.35

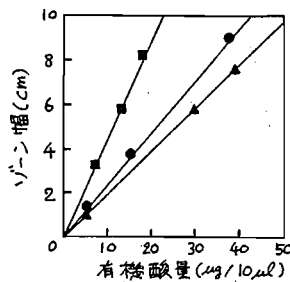


Fig.1. 有機酸検量線  
oxalic acid (■)  
citric acid (●)  
gluconic acid (▲)

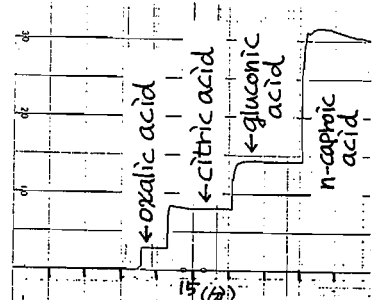


Fig.2. 反応液の泳動図

### 3 血清タンパク質の細管電気泳動

都立大・理・化学

○小島 清嗣, 真鍋 敬, 奥山 典生

血清タンパク質の細管電気泳動による分離は, Hedlund<sup>1)</sup>や Delmotte<sup>2)</sup>らにより試みられているが, タンパク質の同定はまた充分に行われていない。我々は, pK マーカーや精製された血清タンパク質を用いて, タンパク質の同定を試みた。

(方法)

(1) 装置 LKB 2127 Tachophor (細管 -  $\phi 0.5\text{mm} \times 23\text{cm}$ , 7 $\times$ D $\times$ 盤) を用いた。細管部分は kerocone を冷媒として 12 $^{\circ}\text{C}$  に冷却した。検出は UV (254 nm) と示差熱の両方を用いた。

(2) 電解液 先行液は 0.01M  $\text{Cl}^-$  にマキシオールを  $\text{pH}$  を 9.0 にしたもので, 後続液は 0.01M  $\text{E}$ -アミノカプロン酸 - 0.01M マキシオールに水酸化バリウムを加えて  $\text{pH}$  を 10.8 にしたものをを用いた。両液とも, Britj 35 を 0.1% (w/v) にするように加えた。

(3) pK マーカー pK が異なり, UV 吸収をもつ低分子量物質を pK マーカーとして用いた。これらは, 2-4オキシビタール酸, ビルビタール, ヒポキサン-4 $\pi$ , グラウニル, トリプトファン, フェニール, 単独あるいは混合して用いた。

(4) 血清タンパク質 精製されたヒト血清タンパク質として, 日赤中央血液センターで工業的に精製されたアルブミン, トランスフェリン,  $\gamma$ -グロブリンを用いた。

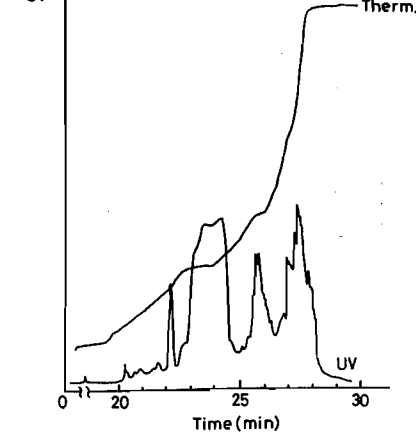
(5) 泳動方法 10% アンホライン ( $\text{pH}$  3.5-10,  $\text{pH}$  9-11,  $\text{pH}$  3.5-10 と  $\text{pH}$  9-11 を 1:1 に混合したもの 3 種を用いた) 0.2  $\mu\text{l}$  をまず注入し, 続いて試料溶液を注入した。泳動は, 125  $\mu\text{A}$  定電流で電圧が 8 kV になるまで行ない, 続いて 40  $\mu\text{A}$  定電流で行なった。

(結果)

(1) pK マーカー 上記 6 種を混合したものを 0.5  $\mu\text{l}$  を試料として泳動したところ, pKa の小さい順 (上記の順序) に泳動された。

(2) 血清タンパク質 上記 3 種の精製タンパク質を単独または混合して泳動したところ, アルブミン, トランスフェリン,  $\gamma$ -グロブリンの順に泳動された。また,  $\gamma$ -グロブリンからは複数の UV ピークが得られた。トランスフェリン溶液を 0.2  $\mu\text{l}$ , 0.4  $\mu\text{l}$ , 0.8  $\mu\text{l}$ , 1.6  $\mu\text{l}$  各々を用いて, UV ピーク面積との関係プロットしたところ良い直線性が得られた。

図1 血清タンパク質の分離図



(3) ヒト血清 図1はヒト血清 1  $\mu\text{l}$  をアンホライン ( $\text{pH}$  3.5-10) 0.2  $\mu\text{l}$  に続いて注入し泳動したものである。図1の結果と比較して, アルブミンを含む分画, トランスフェリンを含む分画,  $\gamma$ -グロブリンを含む分画が同定された。

文献

- 1) Hedlund, K.W., Nicholson, D.E.: J. Chromatogr. 162, 76 (1979)
- 2) Delmotte, P.: Science Tools, 24, 33, (1977)

#### 4 人尿中含硫アミノ酸及びラット組織中のグルタチオン定量.

高知医科大学 化学. 〇見玉 祐敏. 三笠 亨明. 楊田 富子.

人尿中には常に  $S$ -(1,2-Dicarboxyethyl) cysteine (DCEC),  $S$ -(Carboxymethyl) cysteine (CMC),  $S$ -(2-methyl-2-carboxyethyl) cysteine (isocysteine) 等の含硫アミノ酸が排泄されている。これらのアミノ酸は主としてアミノ酸分析器によって定量して来たが、今回、我々は細管式等速電気泳動を応用し、これらのアミノ酸の定量を試みることになった。又その結果はアミノ酸分析器の値とよく一致していた。

動物の組織中のグルタチオン定量は Saville 法, Glutathione reductase による enzymatic recycling 法,  $\alpha$ -phthalaldehyde を用いた蛍光法等で測定されて来た。我々はグルタチオンの定量に Iso-tacho を利用して、その定量を試みた。

Glutathione (GSH) と GSSG の標準品は Leading electrolyte として  $HCl \cdot \beta$ -alanine (pH 3.1 + acetone), Terminal electrolyte として  $n$ -Caproic acid を用いて分離することから可能であった。

次にラット肝臓の homogenate を上記の条件下で分析したところ、標準品の GSH と同じ PV 値をもつゾーンを検出された。そこで、このゾーンが GSH であるかどうかを確認するために標準品の GSH と Liver homogenate を同時に泳動すると同一のゾーンとなった。

又 Liver homogenate と NEM を反応させると、GSH のゾーンが消失し、GSH とは異なる PV 値をもつゾーンが現れた。更に腎臓の  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase と反応させると GSH のゾーンは反応時間と共に消失した。

以上の事より Liver homogenate と標準品の GSH とは同一のゾーンとみて検出されたゾーンは単一の GSH であると判断した。

この方法によりラットの肝臓、心臓、脳中の GSH の定量を行った。その結果本法によって定量した値はこれまで報告された値とよく一致した。



## 5 保存腎臓灌流血液及び尿中成分の量的変動

東京電機大学理工学部, 東京大学医科学研究所\* 東京大学工学部\*\*  
○村勢則郎, 権田金治, 杉本久之\*, 土肥健純\*\*, 福井康裕

**目的** 犬腎臓の常温灌流保存に際して、保存腎臓の生物活性評価判定方法の探索を行なっているが、評価判定の指標となる物質の量を保存中定期的にモニターし、制御することができれば長期間の保存も可能になるかもしれない。

このような目的で本研究は細管式等速電気泳動装置を用いて血液中及び尿中にこのような生物活性の評価判定に都合のよい物質系あるいは情報を見いだそうとするものである。

**方法** 犬保存腎臓中を灌流している人工血液及び尿も定期的に(尿は適時)にサンプリングし、測定に用いた。細管式等速電気泳動(IP-2A, 島津製作所)の測定は血液、尿とも上清を5 $\mu$ lとり、それぞれ有機酸分析条件及び蛋白質・アミノ酸分析条件で測定を行なった。検出は電位勾配検出法及び紫外吸収検出法を併用した。

使用した人工血液はFC-43, オキシフェロール(ミドリ十字社製)で保存中、適時薬剤等を注入することにより一定の制御を行なっている。

**結果** ①有機酸分析条件でモニターしたとき: 血液ではPU値で0.15, 0.30, 0.60付近にシグナルがみられ、成功したと思われる例ではリーディングイオンから比較的すみやかにターミネーティングイオンに移行している。しかし、失敗例の1つのパターンとして保存時間が長くなるにつれてイソタコフェログラムは複雑化したり、変動が激しくなる傾向がみられる。(Fig. 1)

②蛋白質・アミノ酸分析条件でモニターしたとき: 血液のpH調整のために用いられている重炭酸イオンが検出されるようになる。また、紫外吸収検出では血液よりも尿に大きく、かつ複雑な出力パターンが得られるが(Fig. 2)、その傾向は血清酵素(GPT, GOT, LDH, ALP)の酵素活性の示す傾向と比較的よく似ている。

③用いる人工血液の種類・性質によって得られるイソタコフェログラムは血液・尿とも大きく変化する。

**検討** 有機酸分析条件で得られるシグナルの同定及び蛋白質・アミノ酸分析条件での紫外吸収パターンの解析など更にデータを積重ねることによって生物活性評価判定のための情報が得られる期待がもてる。

Fig. 1 L:0.01 M HCl- $\beta$ Alanine, pH 3.60  
T:0.01 M n-Caproic Acid, pH 3.48  
Blood Capillary tube: 26 cm  
Current: 200 $\mu$ A $\rightarrow$ 100 $\mu$ A  
Temp.: 20 $^{\circ}$ C

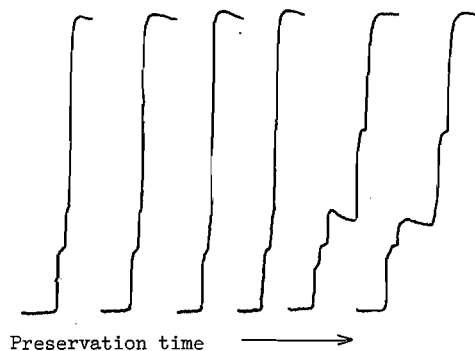
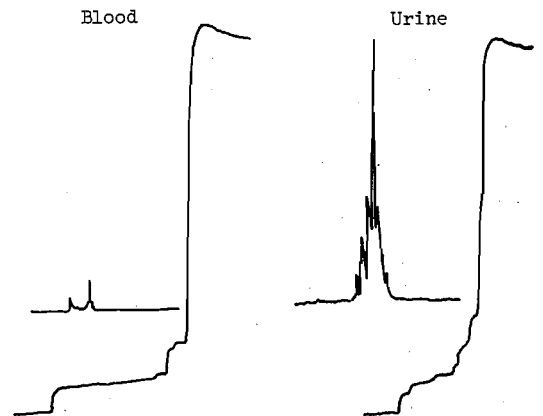


Fig. 2 L:0.01 M HCl-Amediol, PVA, pH 8.9  
T:0.01 M  $\beta$ -Alanine, Ba(OH)<sub>2</sub>, pH 10.9



## 6 イソタコノ臨床応用

—特に血中有機酸及び有機リン酸の測定に關して—

山本忠司・山川 真

大阪大学医学部泌尿器科、医療法人 仁真会白鷺病院

等速電気泳動法は、新しい分析法として工業化学分野や臨床化学分野で応用されはじめている。特に臨床化学分野では、たん白、有機酸、又フレイオド等の分離分析に応用されている。演者らは以前より生体試料にもイソタコを応用すべく実験を試みていたが、今回血中トリカルボン酸サイクル(TCA-cycle)の中間代謝物、乳酸、酢酸及び有機リン酸、特に2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG)を分析し、臨床応用に關して良好な結果を得ているので報告する。

### (I) TCA-cycle 中間代謝物の測定

装置はIP-1B、検出器はPGD-1、UVD2-ip、泳動管は $0.5\text{mm}\phi \times 200\text{mm}$ 、leading electrolyteは $0.01\text{M HCl} + \beta\text{-alanine (pH 3.2)} + 40\% \text{ acetone}$ 、terminating electrolyteは $0.05\text{M n-caproic acid}$ である。対象は、慢性腎不全により血液透析を受けている患者で血液透析中の酢酸ナトリウム負荷時における、血中TCA-cycle 中間代謝物及び酢酸濃度を測定した。試料は血液を瓶外口温したものをそのまゝ用いた。その結果、血液透析中において酢酸、クエン酸、リンゴ酸濃度は上昇し、特にクエン酸出現時には、ゾック7状態となり、血液透析中の症状と酢酸の影響が明らかとなった。

### (II) 血中(l+d)乳酸の測定

装置、泳動条件等は(I)と同じである。対象は(l+d)乳酸を含む透析液により腹膜透析を受けていた患者で、突然の意識障害が発症し、乳酸アシドーシスの疑いにより、たがりにイソタコにより乳酸の測定を行った。検体は血液を遠心分離し、血清をそのまゝ用いた。その結果、l-乳酸( $6\text{mM/l}$ )、d-乳酸( $2\text{mM/l}$ )共に高値を示し、腹膜透析液中の乳酸が原因と考えられる乳酸代謝障害と判明し、初期に対処することができた。現在、たが臨床検査室で行われている乳酸の測定は酵素法が主であり、この症例の様には、d-乳酸代謝障害による乳酸の異常の迅速分析にはイソタコが最も適していると考えられる。

### (III) 血球中2,3-DPGの測定

装置、対象は(I)と同じである。leading electrolyteは $0.005\text{M HCl} + \beta\text{-alanine (pH 3.6)}$ 、terminating electrolyteは $0.005\text{M acetic acid}$ である。試料は血液1mlにMeOH 2mlを加え、遠沈後上清をそのまゝ用いた。(I)の場合と同様、血液透析中の不快感訴発症の原因を探索する為、血液透析前後の赤血球中2,3-DPGを測定し、組織hypoxiaの面から調べた。結果、透析後では2,3-DPGは変化せず、Bohr効果による代償を主体は充分に行っているとはいえず、血液透析による組織hypoxiaが示唆された。

以上の如く、イソタコの臨床応用の有用性は、血液を前処理することなく迅速に測定することができること、酵素法等では測定することのできないイソクエン酸、コハク酸等を同時定量できることで、今後の広い応用が期待される。尚、問題点としては、試料の性質上、大量に泳動を行う場合は、セル、泳動管に汚れが生じやすく、何らかの前処理を行わなければならぬことで、検討を怠るべきでない。

## 7 等速電気泳動(イソタコフォレシス: IP)による食品中のEDTAの検出・定量について

国立衛試・大阪支所 ○伊藤誉志男・鈴木英世・豊田正武  
慶田雅洋

(目的) 欧米ではEDTAの金属封鎖作用を利用して変色防止, 香味保持, 酸敗防止, えび・かに肉のガラス様結晶の形成防止などの目的でフックドソーセージ, ドレッシング, マヨネーズ, かん詰などの食品に使用されている。一方我が国では本品は食品添加物として指定されていないので, 輸入食品中のEDTAを検査する機会が少なくない。本品の定量法としては,  $\text{Co}^{\text{III}}$ ,  $\text{Cr}^{\text{III}}$ とのコンプレックスを比色する方法, 薄層クロマトグラフィー, メチル化物のガスクロマトグラフィーなどが報告されているが, 上記の食品中の分析では満足な結果が得られない。IPを適用する場合には, 塩類等食品中の成分による影響が大きいが, イオン交換クロマトグラフィー(IECC)による簡単な前処理で混在物を除去することができ, 数種食品中の本品の定量において良好な結果を得たのでここに報告する。

(方法) 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置IP-1Bを, 検出器は電位こう配検出器PGD-1を用いた。泳動管は $\phi 0.57\text{cm} \times 20\text{cm}$ , 電流は $100\mu\text{A}$ とした。リーディング液(LS)は0.05% Triton含有の0.01N塩酸を用い,  $\beta$ -アラニンを加えてpHを調整した。ターミナル液は0.01Mカブロン酸を用いた。

(結果及び考察) 測定至適条件の検討: EDTA・2Na水溶液に $\text{FeCl}_3$ を反応させたものについてLSのpHを変化させたところいずれも単一ゾーンとなり, pHが低い程定量感度は良いが, 定量時間が長くなる。迅速性を考えてLSのpHを3.5に定めた。EDTA・2Naと $\text{FeCl}_3$ は等モル反応のため, 余裕を見て1:2のモル比で $\text{FeCl}_3$ を添加した。

EDTAの各種無機キレートEDTA・Feへの変転: EDTAのNa塩及びそのCa, Mg, Cu, Niキレートの水溶液にモル比で2倍の $\text{FeCl}_3$ を加えたところいずれもEDTA・FeになることをIPで確かめ, 食品中の総EDTAをFeキレートとして定量することにした。又, 各種アミノ酸及び有機酸の影響について検討したところ, クエン酸, 酒石酸, リンゴ酸, フマル酸に定量妨害が認められた。

IECCによる前処理: 各種イオン交換樹脂を用いて検討したところ, Dowex 1x4 H型が最適であり, 水及び0.01N塩酸洗浄により, 大部分の塩, たん白質, 糖, アミノ酸及び有機酸を除去した後, 吸着したEDTAを0.2N塩酸で溶出した。

最終的に確立した方法: 食品5gを水45mlでホモジナイズし, 0.1N NaOHで中和した後, Dowex 1x4カラム(1.5x6cm)に流しこみ, 水及び0.01N塩酸で洗浄した後, 0.2N塩酸で溶出し, 溶出液を乾固して塩酸を除去した。残渣を水2mlに溶かし, 0.2M  $\text{FeCl}_3$  0.1mlを加えた後, IPで分析した。マヨネーズ, マーガリン及びドレッシングに本品を100ppm添加して90.2%以上の回収率を得た。

## 8 文化財の保存とイソタコフォレシス

東京国立文化財研究所 ○新井英夫 阿部明由 北村 満

文化財は、その種類と材質、置かれた環境、期間によって、様々な劣化の様相を示す。多岐にわたる文化財のより適切な保存対策を導き出すためには、まず劣化の要因やメカニズムを科学的に把握することが必要である。このような必要にせまられて、新しい境界領域の「文化財保存科学」という分野が誕生した。文化財の保存科学における生物学は、文化財の加害要因となっている生物の生理、生態を究明して、その防除方法を研究、実践することを目的とする。かくして、文化財に発生する生物起因の劣化を防いで、後世に伝えるという役割を分担している。

わが国は、温帯モンスーン気候区に属し、夏季には高温多湿となる。そのために、わが国の文化財は、微生物や昆虫による劣化を受けることが多い。一方、劣化を受けた文化財は、伝統的技術により修復されて現代にまで伝えられてきた。演者らは、文化財の劣化に関与する菌類の代謝生成物ならびにわが国の絵画等の表具、表装に伝統的に用いられている古糊の示す防黴効力の主因を研究し、これを文化財の保存に活用したいと考えてきた。演者らは、菌類が代謝する有機酸が、文化財の劣化および古糊の防黴効力等の主要な一因と推定し、島津製イソタコフォレシスIP-2Aによる有機酸の分析を計画した。

1. 刀剣の錆： 刀剣に発生する錆のなかに、菌類に起因する錆のあることが知られている。その錆を形成する菌類は、Eurotium tonophilum と言われている。

1. 1. 錆の再現： 本菌を鉄製テストピース（ $10 \times 10 \times 3 \text{ mm}$ ）に接種し、これをAW（水分活性）0.94と0.84に調整したコンウエイユニット中で25℃に保って培養し、本菌による錆を形成せしめる。この錆のイソタコフェログラムから錆の主因となる有機酸を分析する。

1. 2. 菌類の生成する有機酸の分析： Eurotium tonophilum、新たに文化財から分離した好稠性糸状菌等を、液体培地に接種し、25℃で2週間および4週間培養し、その培養液中に生成した有機酸を、イソタコフェログラムから定性、定量した。

1. 3. 結果： イソタコフェログラムは、供試菌株の培養液からつぎの有機酸を検出した。すなわち、Eurotium tonophilum は、グルコン酸  $2.7 \times 10^{-5} \text{ mol/ml}$ 、クエン酸とフマル酸をそれぞれ  $6 \times 10^{-7} \text{ mol/ml}$  を生成し、Aspergillus vitricolae は、グルコン酸  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/ml}$  とクエン酸を  $6 \times 10^{-7} \text{ mol/ml}$  生成していた。軸装から分離した Moniliella sp. の2株は、グルコン酸  $1.6 \sim 2 \times 10^{-6} \text{ mol/ml}$ 、クエン酸  $10^{-6} \text{ mol/ml}$ 、オキサロ酢酸  $2 \sim 3 \times 10^{-7} \text{ mol/ml}$  を検出した。

2. 古糊の有機酸： 古糊は、十分に精製した小麦粉を原料とし3年以上低温発酵して製造する。古糊で修復した表具表装は、百年後でも確実に修復可能であり、しかも虫や黴による被害が少ないと云われている。演者らは、古糊中の有機酸の含有量の分析を試みた。

供試した古糊は、装幀師の方々から分与を受けた仕込後1年、5年、10年のものである。分析すると、乳酸と酢酸と含有するもの、イタコン酸しか検出されない古糊などがあつた。分析値の一例を示せば、古糊1g中に乳酸  $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol}$ 、酢酸  $2.9 \times 10^{-4} \text{ mol}$  の有機酸を含有していた。これらの防黴効果についても検討した。

# 9 等速電気泳動分析におけるマイコンの利用

(広大工) ○広川健、木曾義之

ひろかわたけし、きそよしゆき

1. IP分析における分離ゾーンのpH, 成分イオンの実効移動度、濃度等は理論的に計算できる量であり、従ってこれらの諸量を反映するイソタコ五ログラムのシミュレーションが可能である。筆者らはマイクロコンピュータを用い、この特徴を実際の分析に利用するシステムを開発中である。実用化のための問題点と利用の現状について報告する。

2. 使用しているマイコンはSORD MKⅢで、計算結果出力用のドットプリンター(EPSON MP80)とイソタコ五ログラム出力用のX-Yプロッター(渡辺測器 WX-4671)と組合わせている。プログラム言語はBASICである。コンパイルして実行すると、一試料に対する計算時間は通常15秒以下である。

3. 本システムによると、目的試料がある電解液条件(水溶液系)で分離可能かどうかを推定できる。また逆に未知試料の定性指標およびゾーン長より定性、定量分析も可能である。シミュレーションには実験条件の他に目的試料およびカウンターイオン(緩衝、錯形成イオン)の物理定数(絶対移動度 $m_0$ , 酸解離定数 $pK_a$ , 錯安定度定数等)が必要である。これらの定数は文献値を用いているが、中でも $m_0$ に関しては報告が少なく、理論計算を行なう上で一つの障害となっている。現在約500種類のイオン(有機酸239, アミン類127, アミノ酸28, 無機陰イオン57, 陽イオン41)について集積した $m_0$ ,  $pK_a$ のデータをディスクにファイルし(データバンク)、番号で呼び出すことによりデータ入力の迅速化を計っている。実用的システムとするためにはバンクの精度が特に重要であり、シミュレーションの精度に大きく影響する。現在はシミュレーションと実験を繰返しバンクデータの精度の確認を行っている。この場合のシステム利用の流れを図-1に示した。図-1中CIPはシミュレーションのためのプログラムである。もし定性指標の理論値と実測値の差が大きい場合には、実験結果を再現するように $m_0$ または $pK_a$ (場合によっては両方)を最小二乗法により決定する。(図-1MS) ただし何点かpHを変えて実測値を得る必要がある。試料がバンクにない場合も同様である。こうして求めた物理定数を

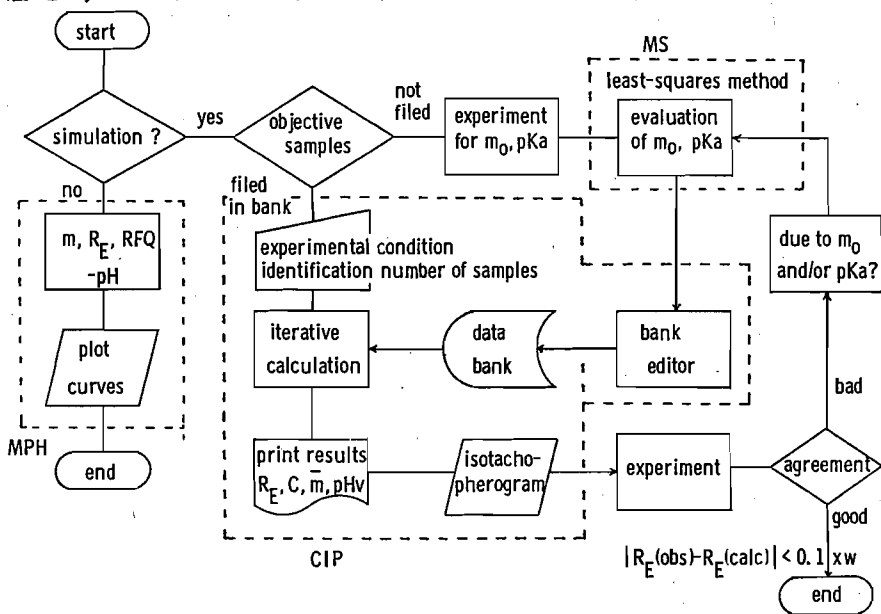


図-1 システム利用の流れ図

をファイルしておくとい後はそのデータを用いて無限に異なる実験条件下での定性指標や定量のための検量線を予測できる。このように本システムは標準的な定性指標等のデータ集積の機能を持ち、今後バンクの拡充と高精度化により有用性が高まるものと考えられる。

<参考文献>

1) F.M. Everaerts, et al. "Isotachopheresis" Elsevier (1967)

2) 木曾義之, 広川健: 第34回島津細管式等速電気泳動セミナー, 等速電気泳動法の現状と将来 (1981)

10 細管式等速電気泳動分析における中性配位子の利用  
(九大工) 田崎正人・高木 誠・上野景平

1. IP法は種々のイオン性化合物の分析に活用されているが、アルカリ・アルカリ土金属の分析では、(K, Rb, Cs, NH<sub>4</sub>), (Na, Mg), (Ca, Sr, Ba)の各グループ内で移動度が近接しているため、通常の条件下では分離が難しい。著者らはこれらのイオンに選択的に相互作用する中性配位子クラウンエーテルに着目し、その錯生成平衡に基づき分離を試みた。

2. リーディング液は、所定濃度のクラウンエーテルを含ませた 5mM トルエンスルホン酸水溶液 (0.01% Triton X-100 を含む) を、ターミナル液は 5mM Bu<sub>4</sub>N・Br 水溶液を用い、島津 IP-2A (泳動管: 1mmid x 40mm + 0.5mmid x 150mm, PGD) により、25°C, 40μA で分析した。

3. 泳動イオン M<sup>nt</sup> がクラウンエーテル L と 1:1 錯体 ML<sup>nt</sup> を形成するとき、実効移動度  $\bar{m}$  は、フリーイオンの移動度  $m_M$ , 錯体の移動度  $m_{ML}$ , 錯生成定数  $K_{ML}$  及びクラウン濃度  $[L]$  を用いて (1) 式で表わされるため、 $m_L$  キ  $m_{ML}$  であれば M<sup>nt</sup> ゾーンの電位こう配  $E_M$  は錯生成により変動する。12C4

$$\bar{m} = (m_M + m_{ML} \cdot K_{ML} [L]) / (1 + K_{ML} [L]) \quad (1)$$

$$K_{ML} = [ML] / [M] \cdot [L] \quad (2)$$

$$PU = (E_M - E_H) / (E_{Bu_4N} - E_H) \quad (3)$$

(12-クラウン-4) 及び 15C5 ではこの効果は小さいが、18C6 を用いた系では図1の結果が得られた。図1より、(a) Li, Mg, Ca, Et<sub>4</sub>N (TEA) は 18C6 と相互作用せず、電位こう配は 18C6 添加によって影響されない。(b) 他のアルカリ金属はクラウン濃度依存性を示し、その大きさは K > Rb > Na, Cs, NH<sub>4</sub> > Li であり錯体の安定度  $K_{ML}$  の序列と一致する。

(c) Sr, Ba は安定度が大きすぎるため、見かけ上電位こう配が変動しない。(d) アルカリ土金属においては、錯体とフリーイオンとで移動度の差が小さい。などの特徴がわかった。一方、分離の点から見ると通常の条件下では分離が難しい各グループについて、18C6 の添加により容易に分離できることがわかる。通常、よく分析の対象とされる K, Na, NH<sub>4</sub>, Mg 及び Ca の分析には、20~40mM のクラウン濃度が適当と考えられる。実際、23mM のクラウン濃度でこれらのイオンの混合物の分析を試みたところ、分離も良く、また直線性の良い検量線も得られた。

これまで、IP分析における分離を良くする方法として、(1) pH制御, (2) 対イオンとの錯形成, (3) 溶媒効果を利用する方法が検討されてきたが、本報における中性配位子の利用も新たな手段となり得ることを示された。

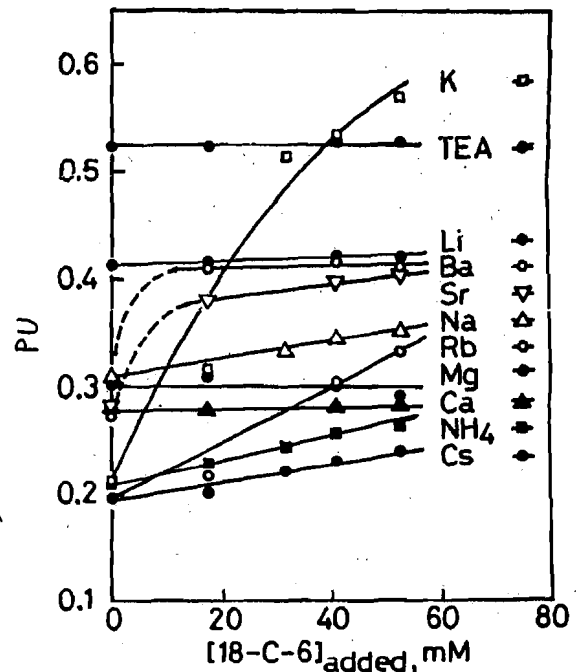


図1. 18C6の添加効果

## 11 細管式等速電気泳動による糖の分析

(近畿大薬) ○本田進, 若狭寿子, 千葉裕一, 掛樋一見

細管式等速電気泳動 capillary isotachopheresis (CIP) の応用は多方面にわたるが、糖を対象とした CIP については報告が少い。それは一般の糖が電気的に中性であるためと思われるが、糖の中にもアルドン酸や酸性ムコ多糖などのイオン性のももあり、また、それ自体は電荷をもたなくても適当な処理によってイオンへ導くことが可能なものもある。さらに適当な試薬との反応によって生成するイオンを分析することにより、間接的な情報を得ることもできる。

本講演においては最近当研究室で得られた、糖分析に関する若干の知見を紹介する。

[装置] 以下の実験はすべて島津 IP-1B 型泳動装置を使用し、0.5 mm I.D., 20 cm のテフロン製泳動セルを用い、室温で行った。検出は島津 PGD-1 型電位勾配検出器によった。

### 1. 酸性ムコ多糖の CIP

酸性ムコ多糖は動物植物の結合組織に多く存在し、生理学的に重要な役割を果たしている。植物性のもはウロン酸が重合した形をとるが、動物性のもは一般にウロン酸とヘキシミンが交互に結合した構造をもち、これに硫酸基が種々の割合で結合している。泳動条件を検討した結果、例へば 0.2% Triton X-100 と含む 0.005 M HCl-NaOH (pH 8.8) をリーディング液、0.01 M カブロン酸 (pH 3.4) をターミナル液とすることによりコンドロイチン硫酸 A および C, ヘパリン, コンドロイチン, ヒアルロン酸等と PU 値によって区別し、同定することができた。しかし、これらすべてを一斉分離できる条件は見出すことができなかった。硫酸基の数の異なるコンドロイチン硫酸について S 含量と PU 値の間に直線関係がみられた。

### 2 アルドースの定量

アルドースを適当な方法で酸化するとアルドン酸を生成するので、生成したアルドン酸の量を測定することによりアルドース量を知らることができる。例へばグルコースをグルコースオキシターゼで酸化し、生成したグルコン酸を定量することにより血糖値を精度よく測定することができた。また、アルドースを化学的にアルドン酸へ導く方法として、亜硫酸ナトリウム水溶液中で加熱する簡便な方法を考案し、これによってアルドースを定量することができた。

### 3 糖の過ヨウ素酸酸化に関連したイオンの一斉分析

糖の過ヨウ素酸酸化によって過ヨウ素酸が還元され、ヨウ素酸、ギ酸、ジアルデヒド等が生成するが、CIP の条件を検討した結果、過ヨウ素酸、ヨウ素酸およびギ酸の一斉定量法を確立することができた。これは従来の滴定法や吸光度法よりも簡便であり、信頼性の高い分析法であり、微量試料で分析できる点が特徴である。また、同時に生成するジアルデヒドは数種のアルデヒドが結合した構造をもち、これを臭素水で酸化してジカルボン酸とした後臭化水素酸で加水分解し、その際に生成したオキシカルボン酸を一斉定量することによって、アルデヒド組成を知ることができた。これらの分析法は微量試料を用いて糖鎖構造を解明する有力な手段となり得る。

女野製菓株式会社

○水口浩之 萩花義 大原國男

頭髮化粧品であるパーマメントウェーブ用剤には、毛髪中のシスチン結合を切断し、軟化させる目的として、チオグリコール酸が用いられているが、この中にはチオグリコール酸の酸化生成物であるジチオジグリコール酸も含まれている。これらの物質の規制及び基準試験法は、厚生省告示第280号のパーマメントウェーブ用剤基準で制定されており、これによると、特にジチオジグリコール酸の分析では、液状亜鉛アマルガムにより、ジチオジグリコール酸をすべて還元し、チオグリコール酸として測定し、本来のチオグリコール酸を差し引いて算出する方法がとられており、再現性も悪く、液状亜鉛アマルガムの廃処理も問題である。そこで細管式等速電気泳動分析法によって、チオグリコール酸及びジチオジグリコール酸の分析を検討した。ここでは、ジチオジグリコール酸の分析について述べる。

試料としては、パーマメントウェーブ用剤を水で5倍希釈し、この希釈液を泳動用試料とした。この操作は、通常の液状亜鉛アマルガムによる還元などの前処理を必要としない点で好ましい。リーディング液はβ-アラニンでpH 3.8に調整した0.01 mol/l HClで、これに0.1%のトリトN-X-100が加えてある。ターミナル液は0.01 mol/l ｎ-カプロン酸を用いた。泳動電流条件は、100μAである。

この系での泳動では、選択的にチオグリコール酸及びジチオジグリコール酸の分析が可能である。図1は、その等速泳動分離図である。また、図2にはチオグリコール酸2~7%中に存在するジチオジグリコール酸の検量線を示した。検量線の作成には、一定量のチオグリコール酸中に任意のジチオジグリコール酸を加えたものを、泳動用試料と同様の試料調製を行ない、これを検量線作成用試料として、その一定量を導入した。縦軸は泳動用試料のゾーン長さであり、横軸はパーマメントウェーブ用剤中に存在するジチオジグリコール酸の濃度である。図から明らかのように、ゾーン長さとはジチオジグリコール酸の濃度との間に直線関係を示した。ただし、検量線を作成する時は一定量のチオグリコール酸(2~7%)を加えて行った方が、再現性が良い。この方法での定量限界は、0.01%である。

このように、ジチオジグリコール酸の定量分析は、細管式等速電気泳動分析法を用いる方が、より迅速で精度よい分析が可能であるばかりでなく、毒性のある物質を使用する必要もなく、分析も容易であり、本法はかなり有力な手段である。

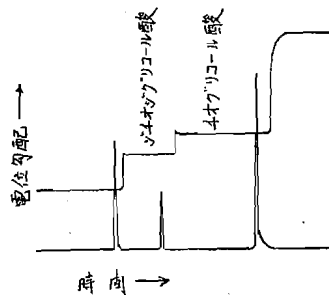


図1 ジチオジグリコール酸とチオグリコール酸の等速泳動分離図 (電位勾配方式)

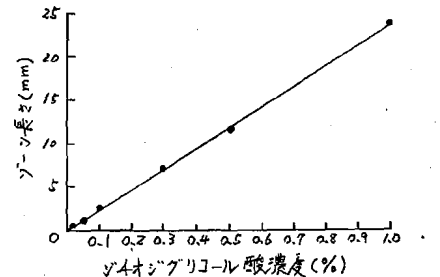


図2 チオグリコール酸(2~7%)中のジチオジグリコール酸濃度の直線性



# 13 高分子電解質の細管式等速電気泳動 (資生堂研) ○山本信也・太田忠男・森川良広

1. 緒言 細管式等速電気泳動法の利用は近年数多くみられているが、その分析対象としては、無機イオン、有機酸、アミノ酸などの比較的分子量のものが多く、一方、高分子領域では、蛋白質以外ほとんどみられていない。演者らは、この領域における本法の適用範囲を広げるべく、高分子電解質への適用を試みてきた。特にムコ多糖においては、既に化粧品中のコンドロイチン硫酸 (ChnS) の分析<sup>1)</sup>、ヒアルロン酸 (HA) の泳動挙動<sup>2)</sup> について報告した。中でもHAの泳動挙動では、分子量的知見を与える本法の新しい利用法を示唆したが、今回はこの点について具体的な検討を加えたので合わせて報告する。

2. 実験 【装置】島津細管式等速電気泳動分析装置IP-1B, [L] 10 mM塩酸 0.1%トリトンX-100,  $\beta$ -アラニン pH 3.2, [T] 10 mMカアロン酸, [泳動管] 0.5 mm I.D  $\times$  30 cm, [泳動電流] 50 ~ 100  $\mu$ A, [恒温槽温度] 20  $^{\circ}$ C,

試料は7種のHAのNa塩 (粘度平均分子量3.8 ~ 102.8万), ChnSのNa塩, 及び常法により精製した他の多糖類を十分真空乾燥後, 2 ~ 5 g/l水溶液を調製した。

3. 結果及び考察 一般に高分子試料を本法に適用した場合、その電位分配曲線は明確な階段信号を与えず、試料ゾーンが現われた後、次第に上昇していき、HAでは高分子量になるにつれて、この傾向が強

くみられた。また求めたHAの検量線は、いずれも直線関係にあったが一致せず、高分子量になるにつれて負の切片をもつようになった。これは試料のもつ粘性による泳動の一部遅れがあるためと思われ、ムコ多糖では分子量10万以上になると、この現象が現われる。そして泳動の遅れは試料負荷量、塩添加の影響を受けず、ほとんど一定であり分子量との相関が認められた (図1)。他方、この遅れのために高分子試料では、移動度の差が十分にあっても、それらの分離は困難になる。ChnSとHAのPU値は0.10と0.23を示すが、その分離は行なわれなかった。分離のために種々の条件について検討した結果、リーディング液にメタノール40%の添加が有効であった。この電解液系では、ChnSとHAは先のPU値とほぼ同じ値を示したが、ゾーン境界面がシャープになり両者の分離が達成された。また、ChnSとトラガントゴムについては泳動の遅れがみられなかった。前者では低粘性、後者ではD-ガラクトン酸を含む一部の成分が泳動しているためと思われる。以上の結果をラットのヒフから抽出したムコ多糖の分析に応用した。ChnSとHAを分離・同定したほか、泳動の遅れを測定することによりHAの分子量を推定することができた (図2)。

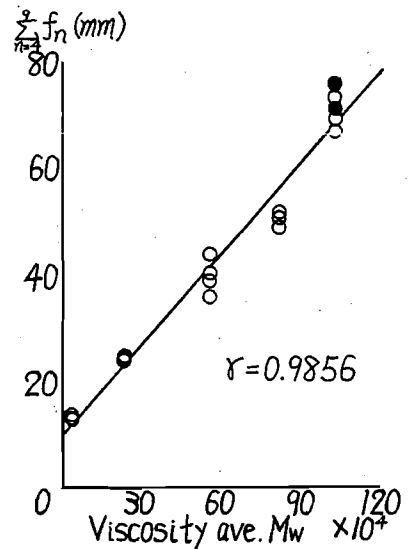


図-1. 泳動の遅れと分子量

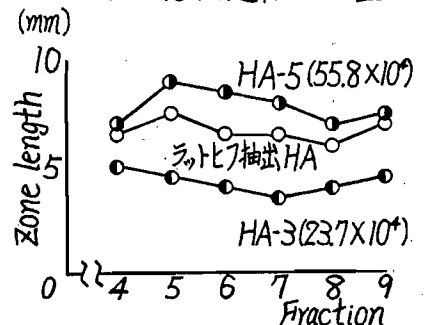


図-2. HAの泳動パターン

- 1) 山本, 太田, 森川; 第20回油化学研究発表会講演要旨集, 29 (1981)
- 2) 山本, 太田, 森川; 日本分析化学会第30年会講演要旨集, 434 (1981)

## (才)報) ISOTACHOPHORESISによるコンドロイチン硫酸ナトリウムの定量

大洋薬品工業株式会社 品質管理部 大平一夫 酒井淑行 佐藤紀巳

[目的] コンドロイチン硫酸は動物の結合組織の基質成分に広く分布し、硫酸基の結合部位の相違からコンドロイチン4-硫酸(CS-A)及びコンドロイチン6-硫酸(CS-C)タイプが知られている。又、コンドロイチン硫酸ナトリウムは血液凝固阻止作用、コリンエステラーゼ抑制作用、組織透過性亢進及び白血球運動亢進等の薬理作用を有することから、神経痛、リウマチ、関節痛等の消炎として、ネフロセ、腎炎等の利尿作用、肝疾患等の解毒作用を適応症として、注射剤並びに経口用剤として広く用いられている。一般に用いられるコンドロイチン硫酸ナトリウムはCS-AナトリウムとCS-Cナトリウムが主体であり、動物種によりこの混合比が変化することから、品質管理上分離確認並びに定量することが必要とされた。従来、この種の製剤についてはイオン含量並びに窒素含量において規格されているため、製剤中に含まれる添加剤の影響を受け易く、精度よく定量することは難しい。このためより簡便に、そして精度よく製剤中のコンドロイチン硫酸ナトリウム含量を測定する方法として等速電気泳動を用いることを検討した。又、CS-AナトリウムとCS-Cナトリウムは赤外線吸収スペクトルでは硫酸基に基づく吸収において差が認められ、又旋光度も異なるが、分離定量は電気泳動法においても移動度に大きな違いはなく難しい。このことから、コンドロイチン硫酸ナトリウム中のCS-Aナトリウム並びにCS-Cナトリウムの分離定量も合わせて検討した。

[実験] 試料は市販のコンドロイチン硫酸ナトリウム注射用原末を、装置は島津ISOTACHOPHORETIC ANALYZER I P-1 Bを使用し、リーディング液には、塩酸、ヒスタジン、 $\beta$ -アラニン、メタノール等を用い、ターミナル液には、カプロン酸、グルタミン酸等を用い検討した。

[結果及び考察] 以下に示す電解液を用い定量を行ったところ、 $10\mu\text{g}$ ~ $100\mu\text{g}$ の範囲で原点を通る直線関係が得られた。またコンドロイチン硫酸ナトリウム注射液につき定量を行った結果、CV値=1.89%で精度よく定量が可能であった。

(組成) リーディング : 0.01M 塩酸  
0.01M ヒスタジン  
30% メタノール  
トリトンX-100

ターミナル : 0.01M カプロン酸

15 細管式等速電気泳動 (CITP) 法の生薬分析への応用

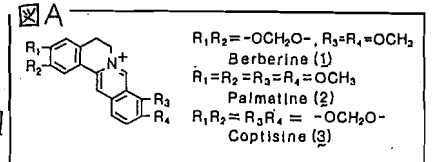
鐘紡(株) (基礎研・漢方研) の <sup>まついひかり</sup> 松居宏典・<sup>きのしまたひ</sup> 木下昌彦

〔目的〕 生薬中には、基本炭素骨格が同じであるが置換基、立体構造等の異なる類縁化合物が共存することが多く、CITP法を広く応用するにはこれらの相互分離が必要である。しかるに、生薬成分は構造が複雑で、かつ pKa 等の物性が未詳であることが多いので、分離条件の選択への手掛かりは少ない。またこの様な類縁化合物間の CITP による分離条件の検討例は少ない。著者らは生薬成分から 4 組の化合物群を選び、化学構造の差が分離の難易度に及ぼす影響を知るため各種の分離条件を検討した。

〔実験〕 装置：IP-2A 検出器：PGD 及び UVD

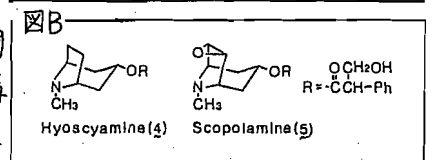
〔結果〕 (I) ベルベリン型アルカロイドの分離 (図 A)

(1) と (2) の分離は既に報告されているとあり、<sup>(a)</sup> さらに今回新たに (3) を加えて分離を試みたところ、L 液の pH が 5 ~ 9 の間で 3 成分は完全に分離した。また、易動度と分子量に相関関係を得た。(1)、(2)、(3) はイオン性官能基が同一であり、構造も類似しているので、この場合、分子量が易動度に最も大きく影響していると考えられた。



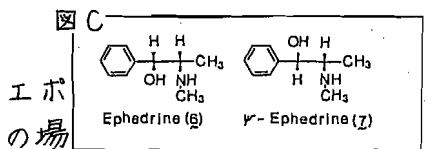
(II) トロパン型アルカロイドの分離<sup>(b)</sup> (図 B)

(4)、(5) は基本炭素骨格は同一であるが、イオン性官能基はエポキシサイドの有無により大きく異なり、pKa にも差がある。この場合、L 液の pH を (5) のプロトン付加を抑制する領域 (8.5 付近) に調整することにより分離可能となった。



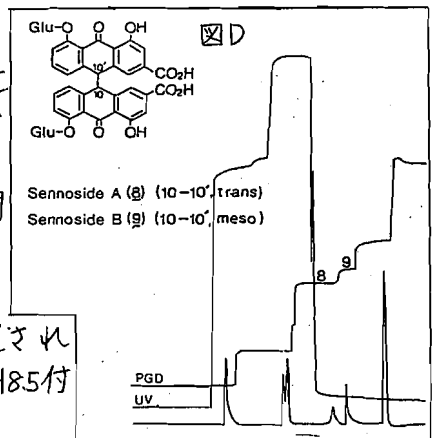
(III) 麻黄アルカロイドの分離<sup>(c)</sup> (図 C)

(6)、(7) は互いに立体異性体であるが、L 液の pH が pKa の近傍である 10 付近でも分離する。しかし、(6) と (7) のアルデヒドに対する反応性の差に着目し、L 液に低分子のアルデヒドを添加し一種の錯体効果を利用することにより、pH 6 ~ 7.5 の間でより安定に分離できた。



(IV) センノサイド A 及び B の分離 (図 D)

(8)、(9) は互いに立体異性体であって、pKa は 3 ~ 5 と推定されるが、この pH 域の L 液では分離は困難であった。しかし、pH 8.5 付近で多量の有機溶媒を添加すると分離は可能となった。



条件：L 液；HCl + トリス (pH 8.5), 80% メタノール T 液；バリオン + Ba(OH)<sub>2</sub>

〔結論〕 上記の 4 例からも分かるように、現状では化学構造の差から分離の難易度あるいは最適 pH 条件等を推定することは非常に困難である。今後、類似化合物の分離に及ぼす諸因子 (例えば、L 液の pH や組成等) の影響の度合が解明されるに従って、僅かな易動度の差を拡大させる為の合理的な条件の設定が可能となることが期待され、それによって、CITP 法の生薬分析への応用も拡大されると思われる。ひきつづき著者らは、以上の結果より、特に有機溶媒の分離機構に及ぼす効果について詳細な研究を行いたいと考えている。

(a) 児嶋, 八木 生薬分析討論会 ('80), ; (b), (c), 松居, 木下ら 日本薬学会 ('81)





